Botulizm bydła – niedoceniony problem epidemiologiczny

TOMASZ GREENDA, KRZYSZTOF KWIATEK, MAGDALENA GOLDSZTEJN

Zakład Higieny Pasz, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 25.04.2020

Zaakceptowano 30.05.2020

Grenda T., Kwiatek K., Goldsztejn M.

Cattle botulism: Underestimated epidemiological problem

Summary

Botulism in cattle is a rarely diagnosed, but highly fatal disease. Laboratory diagnosis of cattle botulism cases is complicated by the high genetic diversity of *C. botulinum* strains. The proper diagnosis of botulism is based mainly on observation of clinical symptoms. In epidemiological investigation, the most important is to consider the genetic diversity of *C. botulinum* strains and the chimeric character of toxins produced by this microorganism. It is also important to investigate the potential vectors and origins of *C. botulinum* spores in order to detect the potential routes of transmission, which are not yet thoroughly understood. Cattle botulism is underestimated worldwide because of the difficulty of classifying its clinical forms and determining its vectors. Very important in the risk management of botulism are adequate sanitization procedures to prevent the spreading of spores and as a consequence new outbreaks of this disease.

Keywords: cattle botulism, *Clostridium botulinum*, botulinum toxins

Beztlenowe laseczki przetrwalnikujące z gatunku *Clostridium botulinum* posiadają zdolność do produkcji najsilniejszych toksyn biologicznych naturalnie występujących w przyrodzie. Toksyny botulinowe (BoNTs) są przyczyną botulizmu – choroby objawiającej się głównie wiotkimi porażeniami mięśni szkieletowych. BoNTs stanowią cynkowo zależne proteazy i oddziałują na kompleks białek błony presynaptycznej neuronu (SNARE). Funkcja SNARE polega na fuzji pęcherzyka synaptycznego wypełnionego neuromediatorem (acetylocholiną) z błoną neuronu. Toksyny typu A i E oddziałują na białko SNAP-25, zaś toksyny B, D, F i G na białko VAMP (synaptobrewinę), podczas gdy toksyna C degradowe białko HPC1 (syntaksynę) i SNAP 25. W wyniku oddziaływania toksyn botulinowych dochodzi do zahamowania mechanizmu uwalniania acetylocholino i objawów botulizmu (9, 26).

Botulizm bydła jest rzadko występującą chorobą o wysokiej śmiertelności, która sprawia duże trudności w leczeniu i diagnostyce. Zwierzęta chore na botulizm mogą wydalać przetrwalniki, które zanieczyszczają miejsca bytowania, źródła poboru wody oraz paszy. Objawy choroby są najczęściej wynikiem spożycia przez zwierzę paszy zanieczyszczonej toksyną botulinową. Ta odmiana botulizmu określana jest jako intoksykacja jelitowa. Rzadziej obserwuje się toksykoinfekcję, w której rozwój przetrwalników

i produkcja toksyny następuje w świetle jelita grubego. Taka odmiana choroby jest zazwyczaj powiązana z immunosupresją i jest wynikiem np. nagłej zmiany diety, przebytej antybiotykoterapii lub wykonanych zabiegów chirurgicznych. Znany jest także botulizm przyranny, kiedy to rozwój przetrwalników *C. botulinum* następuje w zanieczyszczonej ranie. Pod wytworzonym strupem, wewnątrz rany powstają warunki beztlenowe, które są odpowiednie dla rozwoju form wegetatywnych i produkcji toksyny w miejscu zranienia (9).

Postacie kliniczne botulizmu bydła

Podstawą diagnostyki botulizmu bydła jest stwierdzenie charakterystycznych objawów, a przebieg choroby zależy od okresu inkubacji (9, 10). W zależności od czasu występowania objawów wyróżnia się następujące postacie choroby:

- Botulizm nadostry – postać ta występuje stosunkowo rzadko i jest wynikiem spożycia przez zwierzę dużych dawek toksyny botulinowej wraz z paszą. Okres inkubacji choroby wynosi od kilku do 24 godzin. Obserwuje się porażenie wiotkie mięśni szkieletowych. Zwierzęta układają się w pozycji bocznej z charakterystycznie skrzyżowaną szyją, sztywnymi kończynami oraz wypadającym językiem. Przed śmiercią obserwowany jest intensywny ślinotok. Śmiertelność tej postaci dochodzi do 100%.

- Botulizm ostry – w tym przypadku obserwowane są objawy podobne do postaci nadostrej, ale występują one dłużej, nawet do 7 dni. Większość zwierząt układa się w pozycji leżącej, chociaż we wczesnym stadium mogą się powoli poruszać lub wykazywać upośledzone pobieranie paszy i wody. W późniejszym stadium zwierzęta nie są w stanie pobierać pokarmu. Zwierzęta podobnie jak w postaci nadostrej układają się w pozycji bocznej z charakterystycznie skreconą szyją.

- Botulizm przewlekły – rzadka postać (jej występowanie wciąż jest przedmiotem badań i dyskusji), w której oprócz porażień wiotkich występują także niespecyficzne objawy, utrzymujące się nawet powyżej 8 dni. Zwierzęta rzadko układają się w pozycji bocznej. Widoczne jest osłabienie kończyn i niezborność ruchowa. Obserwowana jest znaczna utrata masy ciała wynikająca z problemów z przełykaniem. Występuje utrata mleczności, zaparcia naprzemiennie z biegunką. Śmiertelność w tej postaci choroby waha się w granicach od 8% do 64% (1, 7).

Diagnostyka botulizmu bydła jest skomplikowana ze względu na niedoskonałe metody badawcze i zróżnicowanie genetyczne szczepów *C. botulinum*. Zachorowania u bydła powodują głównie szczepy zdolne do produkcji BoNT C i D, a także toksyn mozaikowych BoNT/CD oraz BoNT/DC. Toksynotwórczość wspomnianych szczepów jest warunkowana konwersją specyficznych bakteriofagów lizogenicznych. Rzadziej schorzenie jest odnotowywane na tle toksyn BoNT/A i BoNT/B wytwarzanych przez szczepy proteolityczne. Wykrywanie *C. botulinum* w rozpatrywaniu przypadku botulizmu jest kluczowym elementem w dochodzeniu epidemiologicznym (20).

Botulizm bydła ma najczęściej przebieg ostry, chociaż coraz częściej pojawiają się doniesienia na temat występowania formy przewlekłej w Europie (29, 32). Jest to jednak niedostatecznie poznana postać i wg niektórych danych może mieć związek z równoległym występowaniem innych czynników sprzyjających np. zaburzeniami mikroflory jelitowej czy niedoborami mikroelementów. Pośrednią przyczyną botulizmu może być także osteofagia, spotykana w szczególności w Afryce. Zaburzenie to objawia się tendencją do spożywania kości przez zwierzęta roślinożerne, w których może być nagromadzona toksyna botulinowa (2, 12, 13, 29).

Leczenie botulizmu bydła

Leczenie botulizmu bydła jest możliwe przez zastosowanie antytoksyn botulinowych. Terapia ta jednak odznacza się niską efektywnością ze względu na wysoką wrażliwość przeżuwaczy na działanie toksyn botulinowych. Zastosowanie antytoksyn wymaga jak najszybszego ich podania, po zaobserwowaniu pierwszych objawów, kiedy aktywna toksyna jest jeszcze obecna we krwi. Postępowanie takie jest w zasadzie możliwe jedynie w ostrym przebiegu zatrucia botuliną.

W warunkach fermowych leczenie jest utrudnione ze względu na dużą liczbę zwierząt, dlatego skutecznym sposobem na powstrzymanie rozprzestrzeniania się choroby jest eliminacja potencjalnych źródeł przetrwalników i toksyn botulinowej (2). Obecnie w wielu krajach obserwuje się wzrostową tendencję występowania przypadków botulizmu bydła. Odnotowywany jest także udział nowych wektorów w transmisji tej choroby, tj. stosowanie odpadów z biogazowni w nawożeniu pól uprawnych (6).

Diagnostyka laboratoryjna botulizmu bydła

Diagnozowanie laboratoryjne botulizmu jest utrudnione ze względu na wspomnianą wysoką wrażliwość bydła na działanie toksyn botulinowych. W przypadku badania surowicy krwi wymagane jest szybkie jej pobranie, co może mieć uzasadnienie tylko w ostrej postaci choroby. W innych przypadkach powinno się dążyć do jak najszybszego wykonania badania, a preferowanymi materiałami do analiz są próbki wątroby oraz treść przewodu pokarmowego. Treść przewodu pokarmowego i narządy wewnętrzne powinny być przekazane do laboratorium w odpowiednio zabezpieczonych pojedynczych pojemnikach ze względu na możliwą degradację toksyn przez proteazy pochodzące z narządów (2). W analizie laboratoryjnej zaleca się także badanie próbek paszy i wody jako potencjalnych źródeł toksyny oraz przetrwalników *C. botulinum*. Próbkę powinny być dostarczone do laboratorium w warunkach chłodniczych, aby uniknąć degradacji toksyny (2, 14).

W dochodzeniu epidemiologicznym najczęściej stosuje się metody bazujące na próbie biologicznej przeprowadzanej na myszach laboratoryjnych lub w przypadku identyfikacji mikroorganizmu oparte na technice PCR. Metody wykorzystujące technikę PCR umożliwiają detekcję DNA bezpośrednio z próbki, po przednamnożeniu w bulionach nieselektywnych, lub procesie izolacji na podłożach agarowych. Jednakże, próbki środowiskowe często badane w przypadkach botulizmu bydła, tj. gleba czy odchody zawierają inhibitory PCR, które mają wpływ na wydajność tej reakcji. Inhibitory reakcji PCR tj. substancje humusowe, kwasy fulwowe, polisacharydy, białka i inne związki organiczne mogą być ekstrahowane razem z DNA i zaburzać proces amplifikacji. Z tego względu przy wykrywaniu *C. botulinum* bezpośrednio w próbce bądź z hodowli w pożywce płynnej niezbędny jest etap pracochłonnego oczyszczania DNA. Metody ekstrakcji różnią się od siebie wydajnością odzysku DNA. Nie istnieje jedna standardowa metoda ekstrakcji odpowiednia dla wszystkich mikroorganizmów. Ekstrakcja DNA z Gram-dodatnich bakterii przetrwalnikujących jest skomplikowana i wymaga zastosowania odpowiednich warunków hodowli w celu uzyskania jak największej liczby form wegetatywnych (15).

W genotypowaniu *C. botulinum* stosuje się metody bazujące na amplifikacji genów 16S rRNA połączonej

z sekwencjonowaniem amplikonów. Stosowana jest także technika PFGE stanowiąca tzw. „złoty standard”. Coraz częściej wykorzystywane jest także sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) umożliwiające analizowanie całych genomów (14).

Toksynotwórczość *C. botulinum* typów C i D, które najczęściej wywołują botulizm bydła, jest uwarunkowana występowaniem w środowisku specyficznych bakteriofagów lizogenicznych. Niektóre szczepy typu C i D są zdolne dodatkowo do produkcji toksyn C2 i C3 nie mających właściwości neurotoksycznych, stąd też typ BoNT/C opisany jest niekiedy jako toksyna C1. Szczepy, które utraciły specyficzny bakteriofag nie są zdolne do produkcji neurotoksyny, lecz wciąż wytwarzają toksynę C2, która składa się z dwóch niezwiązanych ze sobą protein C2I i C2II. Wspomniane bakteriofagi warunkują także wytwarzanie toksyny C3 (egzoenzymu). Sagaguchi i wsp. (31) określili kompletną sekwencję konwertującego faga toksotypu C, który był wyizolowany ze szczepu *C. botulinum* typu C Stockholm. Bakteriofag ten ma podwójną nić DNA o wielkości 185 683 pz (par zasad) i zawiera 26,3% G/C. Lizogeniczność bakteriofagów C i D jest niestabilna podczas procesu hodowli, co jest powodem trudności w procesie izolowania *C. botulinum* wspomnianych typów i dochodzeniu epidemiologicznym (31).

Botulizm bydła – wektory i źródła choroby

Drobnoustroje z gatunku *C. botulinum* są spotykane głównie w glebie, osadach morskich, a także w kale chorych zwierząt, rozkładających się zwłokach małych ptaków i ssaków które mogą zanieczyszczać wewnętrzne warstwy przyłóżek oraz baloty kiszunkowe. Prawdopodobieństwo zachorowania na botulizm zwiększa także nawożenie organiczne pól uprawnych, z których pozyskiwane są materiały paszowe wykorzystywane w produkcji kiszzonek. Niektóre raporty wskazują na przypadki botulizmu bydła w związku z osteofagią występującą na terenach ubogich w fosfor. Epidemie botulizmu były wielokrotnie wiązane ze stosowaniem pomiotu kurzego jako składnika paszy. Przypadki tej choroby były także powiązane z nieprawidłowo prowadzonym procesem technologicznym wytwarzania pasz. Stwierdzano botulizm bydła po skarmianiu bydła kiszunkami zanieczyszczonymi przetrwalnikami pochodzącymi z gleby lub z rozkładających się zwłok ptaków i ssaków. Jako przyczynę botulizmu bydła upatrywano także spożycie przez zwierzęta zanieczyszczonego słoju, w którym mogło dochodzić do rozwoju przetrwalników *C. botulinum*. Na przestrzeni ostatnich kilku dekad wiele przypadków botulizmu u bydła była wiązana ze stosowaniem pomiotu kurzego jako nawozu lub jako konsekwencja jego składowania na pastwiskach. W ostatnich latach jako potencjalną przyczynę wskazuje się także stosowanie w nawożeniu pól uprawnych oraz pastwisk dygestatów z biogazowni. Przypadki tej choroby od-

notowywano na terenach o dużym zagęszczeniu biogazowni, w wyniku nawożenia dygestatami (13, 14).

Nawozy organiczne, w szczególności pomiot drobiowy, mogą sprzyjać przenikaniu przetrwalników *C. botulinum* typu D na pola uprawne, a w konsekwencji późniejszej kontaminacji kiszzonek. Ptaki wykazują wysoką odporność na działanie BoNT/D, która może być z kolei czynnikiem etiologicznym botulizmu bydła. Teoria na temat asymptomatycznego nosicielstwa przetrwalników *C. botulinum* u drobiu nie została potwierdzona. Przetrwalniki tego patogenu nie były wykrywane u zdrowego drobiu (11, 36). Z drugiej strony, nie wyklucza się nosicielstwa przetrwalników na niskim poziomie, poniżej limitów wykrywalności dotychczas stosowanych metod. Wielokrotnie, w przeszłości wiązano kontaminację krzyżową pasz pomiotem z występowaniem botulizmu bydła. Jednakże trudność w jednoczesnym izolowaniu tych samych szczepów *C. botulinum* na fermach drobiu i farmach bydła, gdzie doszło do wystąpienia schorzenia, jest przyczyną niejednoznaczności w potwierdzeniu potencjalnego nosicielstwa. Istnieją nieliczne raporty potwierdzające tę teorię. Souillard i wsp. (35) opisali przypadek botulizmu bydła na tle toksyny wytwarzanej przez szczep mozaikowy *C. botulinum* CD, który był izolowany także na fermie brojlerów zlokalizowanej w pobliżu farmy bydła. Szczep ten wyhodowano również z posiewów 7 próbek wymazów pobranych z obuwia używanego w gospodarstwie oraz systemu wentylacyjnego. Równolegle taki sam szczep *C. botulinum* wyizolowano z 4 próbek zebranych na terenie farmy bydła, tj. dwóch wymazów z obuwia używanego na pastwiskach, a także z próbki kiszonki oraz jednej próbki pomiotu zebranego z analizowanego pastwiska. Fakt równoczesnego stwierdzenia takich samych szczepów na fermie drobiu i farmie bydła nie wyklucza jednak możliwości jego przeniesienia przez gryzonie lub inne gatunki zwierząt (35).

W ostatnich latach odnotowywane są przypadki tzw. botulizmu przewlekłego. Jedną z hipotez wskazuje na przypuszczalną kolonizację jelita cienkiego, a w konsekwencji produkcję toksyny przez *C. botulinum* w jego świetle. Ciągła resorpcja toksyny botulinowej uznawana jest za przyczynę botulizmu przewlekłego której towarzyszą niespecyficzne objawy kliniczne, tj. biegunka, zapalenie racic czy obrzęki żyłne. W celu udowodnienia tej hipotezy Fröschle i wsp. (6) przeprowadzili badania kontrolne na 92 farmach bydła, na których wystąpiły objawy wskazujące na botulizm przewlekły. Ponad połowa, tj. 47 farm, była zlokalizowana na terenie północnych Niemiec, gdzie występuje największe zagęszczenie biogazowni. Autorzy dokonali analizy 1388 próbek odchodów bydła. W próbkach tych nie stwierdzono występowania BoNT przy zastosowaniu testu biologicznego na myszach. Uznano, że przyczyna objawów przypisywanych botulizmowi przewlekłemu może wynikać z działania wielu powiązanych ze sobą czynników. W badaniach określano

także występowania patogennych drobnoustrojów rodzaju *Clostridium* w próbkach dygestatów z biogazowni. Analizy przeprowadzono z zastosowaniem metod real-time PCR umożliwiających wykrywanie gatunków *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. novyi*, *C. haemolyticum*, *C. septicum* i *C. chauvoei*. Nie wykazano występowania wymienionych gatunków w próbkach badanych dygestatów, poza *C. novyi* (3,9% próbek) oraz *C. difficile* (44,8%).

Bezpieczeństwo produktów mlecznych i mięsa wołowego a botulizm bydła

Dotychczas nie określono możliwości przenikania toksyn botulinowych do mleka w przypadku botulizmu u krów mlecznych (16). Do chwili obecnej opublikowano jedynie jedną pracę na temat badań doświadczalnych przeprowadzonych na szczurach laboratoryjnych, u których wywołano botulizm jelitowy (postać toksykoinfekcji). Uzyskane wyniki wskazują na możliwość przenikania toksyn botulinowych do mleka szczurów (17). Natomiast inne doświadczenia wykonane przez Moeller i wsp. (18) na krowach mlecznych nie wykazały możliwości przenikania toksyny botulinowej do mleka. Böhnelt i Gessler (4) opisali kontaminację mleka krowiego toksyną botulinową oraz przetrwalnikami *C. botulinum*. Uznali jednak, że prawdopodobnym źródłem toksyny i przetrwalników było wtórne zanieczyszczenie. Także Cobb i wsp. (5) rozpatrując ewentualne implikacje związane z oddziaływaniem botulizmu bydła na zdrowie człowieka, stwierdzili, że w organizmie krowy nie ma miejsca zjawisko przenikania toksyn botulinowych do mleka. W 2019 r. Bano i wsp. (3) analizowali przypadek botulizmu u krów mlecznych na tle *C. botulinum* typu C, badając próbki mleka tankowego uzyskali wynik negatywny przy zastosowaniu testu biologicznego na myszach. Dostępne dane dotyczące wpływu obróbki cieplnej na toksyny botulinowe wskazują, że pasteryzacja w temperaturze 72°C przez 15 s powinna zapewnić inaktywację toksyn botulinowych w mleku (38). Natomiast konwencjonalna pasteryzacja w temperaturze 63°C przez 30 min wydaje się mniej skuteczna (The Center For Food Security and Public Health. Botulism [Online]. 2018. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/botulism.pdf>).

Zaleca się, aby nie wprowadzać do obrotu i przetwórstwa mleka pochodzącego od krów wykazujących symptomy tej choroby. W Wielkiej Brytanii rekomendowana jest 14-dniowa (wg UK Food Standards Agency), a we Francji 15-dniowa karencja liczona od ustąpienia objawów do czasu wprowadzenia mleka do obrotu (16). Zachorowania w ognisku botulizmu u bydła mają niekiedy przebieg dwufazowy, na który składa się faza szybka manifestująca się objawami chorobowymi w ciągu pierwszych kilku dni, zaś faza druga, tzw. opóźniona, ma miejsce dopiero po około dwóch tygodniach od ekspozycji na czynnik chorobotwórczy (14, 19, 21), dlatego tak istotne jest zachowanie od-

powiedniego, zalecanego w niektórych krajach okresu karencji. Ryzyko dla zdrowia ludzkiego stwarzane przez spożywanie mleka od krów chorych na botulizm uważa się za znikome lub nieistotne w związku z jego obróbką termiczną. Prawdopodobieństwo rozwoju botulizmu niemowląt, nawet przez mniej patogenne szczepy BoNT C, D, C/D i D/C, jest do chwili obecnej mało jasne i wymaga dalszych badań (14).

Niezależnie od typu toksyny botulinowej, mięso pozyskane od zwierząt chorych na botulizm jest niezdatne do spożycia. Ryzyko wynikające ze spożywania mięsa zwierząt rzeźnych nie wykazujących objawów klinicznych, ale pochodzących z gospodarstw, w których miało miejsce schorzenie, jest uznawane za bardzo niskie (14).

Czyszczenie i dezynfekcja obiektów inwentarskich

Toksyny botulinowe są wrażliwe na działanie czynników środowiskowych, a stopień ich inaktywacji uzależniony jest od temperatury, wilgotności i czasu ekspozycji na światło słoneczne (29, <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/botulism.pdf>). Toksyny botulinowe mogą być także inaktywowane chemicznie poprzez zastosowanie 0,1% podchlorynu sodu lub 0,1 N wodorotlenku sodu (<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/botulism.pdf>).

Przetrwalniki *C. botulinum* są wyjątkowo odporne na działanie czynników środowiskowych, a także środków dezynfekcyjnych (35, 37, 39). Nawet po dokładnej dezynfekcji przetrwalniki mogą pozostać. Istnieje możliwość wtórnego zanieczyszczenia przez chrząszcze, systemy wentylacji, wodę w poidłach lub glebę (14). Na uwagę zasługuje fakt, że pozostałe w środowisku farmy przetrwalniki *C. botulinum* stanowią potencjalne wtórne źródło choroby (25). Wszelkie pomieszczenia, poidła, koryta muszą być dokładnie oczyszczone, a następnie zdezynfekowane. Znane są nieliczne środki dezynfekcyjne zapewniające skuteczną eliminację przetrwalników *C. botulinum*, m.in.: podchloryn sodu, kwas octowy (3, 24), aldehyd glutarowy (24), nadtlenek wodoru (27). Etylen, tlenek propylenu i formaldehyd inaktywują przetrwalniki *C. botulinum*, ale wymagany długi czas ekspozycji powoduje, że są one uznawane jako substancje o niskiej efektywności (33). Pomimo wysokiej toksyczności formaldehyd jest nadal używany przy dezynfekcji w ogniskach botulizmu. Większość wymienionych powyżej środków dezynfekujących jest bardzo toksyczna, a w związku z tym bezpieczne obchodzenie się z nimi wymaga użycia specjalistycznego sprzętu ochronnego. Ocenę skuteczności procedur dezynfekcji można przeprowadzić poprzez pobieranie wymazów z miejsc krytycznych, które są trudne do odkażenia. Jest to istotne, aby ustalić, czy dodatkowe zabiegi są konieczne przed ponownym zasiedleniem pomieszczeń przez zwierzęta. W celu zapobiegania nawrotów choroby zaleca się, aby zewnętrzne place wybiegów były odkażane przy zastosowaniu wapna palonego (14).

Postępowanie z obornikiem

W przypadku wystąpienia ogniska botulizmu u zwierząt gospodarskich produkowany obornik pozostaje zanieczyszczony przetrwalnikami *C. botulinum* i może być źródłem kolejnych zachorowań (14, 23). W szczególności, zanieczyszczony pomiot kurzy może stanowić duże zagrożenie dla bydła (27, 28, 34). Gessler i Böhnelt (8) wykazali, że przetrwalniki *C. botulinum* mogą przetrwać nawet do 939 dni w glebach nawożonych zanieczyszczonym kompostem. W Rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 (30) określono szczegółowe zasady postępowania z obornikiem jako niebezpiecznym materiałem ubocznym pochodzenia zwierzęcego. Zgodnie z tym rozporządzeniem dozwolone jest bezpośrednie nawożenie obornikiem uzyskanym w gospodarstwach rolnych. Jeśli jednak istnieje ryzyko związane z bezpieczeństwem jego stosowania, to należy podjąć odpowiednie postępowanie. W praktyce stosuje się wówczas: spalenie na polu, wapnowanie lub spopielenie w spalarni. Spalenie obornika na polu powinno być przeprowadzane z zachowaniem odpowiednich środków ostrożności, aby uniknąć powstania pożaru i nadmiernej emisji produktów spalania do środowiska (14). Zdaniem Le Maréchal i wsp. (14) przetrwalniki *C. botulinum* nie występują w resztkach spalonego obornika. Dla przyspieszenia spalania obornika, można dodać 5-7% wapna gaszonego (wodorotlenku wapnia) w celu zmniejszenia jego ilości. Wykazano jednak, że taki obornik może nadal zawierać przetrwalniki *C. botulinum*. Wspomniane uprzednio spalenie obornika w spalarni jest zabiegiem kosztownym, a transport zanieczyszczonego obornika z gospodarstwa może powodować powiększenie obszaru rozprzestrzeniania się zarodników. Ponadto, należy przeprowadzić odkażanie sprzętu używanego do transportu obornika (14).

Innym sposobem postępowania unieszkodliwiającego zanieczyszczony przez *C. botulinum* (typy C, D, C/D lub D/C) obornika, który został uprzednio poddany wstępnej obróbce cieplnej w temperaturze 70°C przez 1 godzinę, jest termofilna beztlenowa fermentacja w biogazowni (14). Alternatywnym rozwiązaniem może być też mezofilna fermentacja beztlenowa obornika, bez wstępnej obróbki cieplnej, którą prowadzić można w biogazowni zlokalizowanej w gospodarstwie. Tak przeprowadzony proces nie zapewnia jednak zadawalającej eliminacji przetrwalników *C. botulinum* (14, 22).

Obecnie brak jest optymalnego rozwiązania w zakresie postępowania z obornikiem zanieczyszczonym przetrwalnikami *C. botulinum*. W przypadku wystąpienia ogniska choroby obornik jest trwale zanieczyszczony i może stanowić potencjalne źródło ponownego zachorowania, dlatego konieczne jest jego unieszkodliwienie.

Podsumowanie

Unia Europejska finansuje projekty zmierzające do rozwoju i doskonalenia procedur diagnostyki bo-

tulizmu zwierząt z wykorzystaniem coraz bardziej zaawansowanych badań laboratoryjnych. Dobrym przykładem w zakresie takich badań był międzynarodowy projekt ANIBOTNET, realizowany w latach 2016-2019, przy współudziale 9 ośrodków naukowo-badawczych (3). Celem badań było między innymi opracowanie procedur postępowania zmierzających do lepszej prewencji oraz kontroli botulizmu zwierząt i ocena aktualnego stanu wiedzy na temat właściwości szczepów *C. botulinum* grupy III (toksotypy C i D) mających największe znaczenie w etiologii botulizmu u zwierząt.

Wykrywanie *C. botulinum* i toksyny botulinowej jest utrudnione ze względu na genetyczne zróżnicowanie szczepów oraz właściwości produkowanych przez ten mikroorganizm toksyn. Prawidłowe rozpoznanie botulizmu opiera się głównie na diagnostyce różnicowej objawów klinicznych. Diagnostyka laboratoryjna botulizmu bydła na tle toksyntypów C i D, powinna być przedmiotem intensywnych badań uwzględniających aspekt zmienności genetycznej.

Światowa Organizacja Zdrowia Zwierząt (OIE) oraz UE nie ustanowiły jeszcze laboratorium referencyjnego do diagnostyki botulizmu zwierząt. W PIWet-PIB w Puławach obecnie trwają prace nad rozwojem metod biologii molekularnej w wykrywaniu genów klastra botulinowego, ze szczególnym uwzględnieniem typów C i D. W związku z tym możliwe jest nadsyłanie do PIWet-PIB w Puławach próbek do badań pochodzących z przypadków podejrzenia botulizmu u zwierząt. Dokonywana jest także ocena sytuacji epidemiologicznej w Polsce poprzez zbieranie informacji na temat przebiegu poszczególnych przypadków u zwierząt, potencjalnych źródeł i wektorów schorzenia. W ramach tych działań prowadzona jest ankietyzacja zgodnie z formularzem umieszczonym na stronie PIWet – PIB w zakładce „Botulizm”.

Piśmiennictwo

1. Alemu B., Ayele M.: Review on Botulism in Cattle. Applied Journal of Hygiene 2018, 7, 17-25.
2. Anniballi F., Fiore A., Löfström C., Skarin H., Auricchio B., Woudstra C., Bano L., Segerman B., Koene M., Båverud V., Hansen T., Fach P., Tevell Åberg A., Hedeland M., Olsson Engvall E., De Medici D.: Management of animal botulism outbreaks: from clinical suspicion to practical countermeasures to prevent or minimize outbreaks. Biosecurity and Bioterrorism 2013, 11, 191-199.
3. Bano L., Tonon E., Fabi A., Drigo I., Zandonà L., Brunetta R., Viel L., Bravo A., Genovese S., Moschioni C., Sernagiotto S., Tavella A.: Public health risks related to type C botulism in dairy cattle: a case report. Workshop on risk associated with animal botulism and ANIBOTNET final meeting, Maisons-Alfort 2019.
4. Böhnelt H., Gessler F.: Presence of *Clostridium botulinum* and botulinum toxin in milk and udder tissue of dairy cows with suspected botulism. Vet. Rec. 2013, 172, doi: 10.1136/vr.100418.
5. Cobb S. P., Hogg R. A., Challoner D. J., Brett M. M., Livesey C. T., Sharpe R. T., Jones T. O.: Suspected botulism in dairy cows and its implications for the safety of human food. Vet. Rec. 150, 5-8.
6. Frösche B., Messelhäuser U., Höller C., Leubner M.: Fate of *Clostridium botulinum* and incidence of pathogenic clostridia in biogas processes. J. Appl. Microbiol. 2015, 4, 936-947.
7. Galey F. D., Terra R., Walker R., Adaska J., Etchebarne M. A., Puschner B., Fisher E., Whitlock R. H., Rocke T., Willoughby D., Tor E.: Type C botulism in dairy cattle from feed contaminated with a dead cat. J. Vet. Diagn. Invest. 2000, 12, 204-209.

8. Geesler F., Bohnel H.: Persistence and mobility of a *Clostridium botulinum* spores population introduced to soil with spiked compost. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2006, 58, 384-393.
9. Grenda T., Kukier E., Goldsztejn M., Kozieł N., Kwiatek K.: Botulism: Current problem in veterinary medicine. *Med. Weter.* 2016, 72, 152-156.
10. Grenda T., Kwiatek K.: *Clostridium botulinum* – charakterystyka i znaczenie epidemiologiczne. *Med. Weter.* 2009, 65, 743-746.
11. Hardy S. P., Kaldhusdal M.: Type C and C/D toxigenic *Clostridium botulinum* is not normally present in the intestine of healthy broilers. *Veterinary Microbiology* 2013, 165, 466-468.
12. Krüger M., Neuhaus J., Herrenthey A. G., Gökce M. M., Schrödl W., Shehata A. A.: Chronic botulism in a Saxony dairy farm: sources, predisposing factors, development of the disease and treatment possibilities. *Anaerobe* 2014, 28, 220-225.
13. Krüger M., Shehata A. A., Schrödl W., Rodloff A.: Glyphosate suppresses the antagonistic effect of *Enterococcus* spp. on *Clostridium botulinum*. *Anaerobe* 2013, 20, 74-78.
14. Le Maréchal C., Derman Y., Dorner M., Anniballi F., De Santis P., Souillard R., Seyboldt C., Hedeland M., Skarin H., Tevell Aberg A., Bano L.: Procedure and guidelines for the management of animal botulism. ANIBOTNET Consortium, Francja (Paryż) 2020.
15. Le Maréchal C., Fourour S., Ballan V., Rouxel S., Souillard R., Chemaly M.: Detection of *Clostridium botulinum* group III in environmental samples from farms by real-time PCR using four commercial DNA extraction kits. *BMC Research Notes* 2018, 11, 441.
16. Lindström M., Myllykoski J., Sivela S., Korkeala H.: *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2010, 50, 281-304.
17. Moberg L. J., Sugiyama H.: The rat as an animal model for infant botulism. *Infect. Immun.* 1980, 29, 819-821.
18. Moeller R. B., Puschner B., Walker R. L., Locke T., Galey F. D., Cullor J. S., Ardans A. A.: Determination of the median toxic dose of type C botulinum toxin in lactating dairy cows. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2003, 15, 523-526.
19. Myllykoski J., Lindström M., Keto-Timonen R., Söderholm H., Jakala J., Kallio H., Sukura A., Korkeala H.: Type C bovine botulism outbreak due to carcass contaminated non-acidified silage. *Epidemiology and Infection* 2009, 137, 284-293.
20. Nakamura K., Kohda T., Umeda K., Yamamoto H., Mukamoto M., Kozaki S.: Characterization of the D/C mosaic neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* associated with bovine botulism in Japan. *Vet. Microbiol.* 2010, 140, 147-154.
21. Neill S. D., McLoughlin M. F., McIlroy S. G.: Type C botulism in cattle being fed ensiled poultry litter. *Vet. Rec.* 1989, 124, 558-560.
22. Neuhaus J., Schrödl W., Shehata A. A., Krüger M.: Detection of *Clostridium botulinum* in liquid manure and biogas plant wastes. *Folia Microbiol. (Praha)* 2015, 60, 451-456.
23. Notermans S., Dufrenne J., Oosterom J.: Persistence of *Clostridium botulinum* type B on a cattle farm after an outbreak of botulism. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981, 41, 179-183.
24. Oie S., Obayashi A., Yamasaki H., Furukawa H., Kenri T., Takahashi M., Kawamoto K., Makino S. I.: Disinfection methods for spores of *Bacillus atrophaeus*, *B. anthracis*, *Clostridium tetani*, *C. botulinum* and *C. difficile*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2011, 34, 1325-1329.
25. Okamoto K., Sato K., Adachi M., Chuma T.: Epidemiological factors in chicken botulism. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association* 1999, 52, 168-173.
26. Parasion S., Bartoszcze M., Gryko R.: Struktura i mechanizm działania neurotoksyn bakterii rodzaju *Clostridium*. *Przegl. Epidemiol.* 2007, 61, 519-527.
27. Payne J. H., Hogg R. A., Otter A., Roest H. I. J., Livesey C. T.: Emergence of suspected type D botulism in ruminants in England and Wales (2001 to 2009), associated with exposure to broiler litter. *Vet. Rec.* 2011, 168, 640.
28. Rehn A., Dorso L., Douart A., Chartier C., Guaatteeo R., Mazuet C., Popoff M. R., Assie S.: A large outbreak of bovine botulism possibly linked to a massive contamination of grass silage by type D/C *Clostridium botulinum* spores on a farm with dairy and poultry operations. *Epidemiol. Infect.* 2017, 1-9.
29. Rodloff A. C., Krüger M.: Chronic *Clostridium botulinum* infections in farmers. *Anaerobe* 2012, 18, 226-228.
30. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 z dnia 21 października 2009 r. określające przepisy sanitarne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego, nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi.
31. Sakaguchi Y., Suzuki T., Yamamoto Y., Nishikawa A., Oguma K.: Genomics of *Clostridium botulinum* group III strains. *Res. Microbiol.* 2015, 166, 318-325.
32. Skarin H., Tevell Aberg A., Woudstra C., Hansen T., Löfström C., Koene M., Bano L., Hedeland M., Anniballi F., De Medici D., Olsson Engvall E.: The Workshop on Animal Botulism in Europe. *Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice, and Science* 2013, 11, Supplement 1.
33. Smith G. R., Hime J. M., Keymer I. F., Graham J. M., Olney P. J., Brambell M. R.: Botulism in captive birds fed commercially-bred maggots. *Vet. Rec.* 1975, 97, 204-205.
34. Souillard R., Le Marechal C., Ballan V., Mahe F., Chemaly M., Le Bouquin S.: A bovine botulism outbreak associated with a suspected cross-contamination from a poultry farm. *Vet. Microbiol.* 2017, 208, 212-216.
35. Souillard R., Le Maréchal C., Hollebecque F., Rouxel S., Barbé A., Houard E., Léon D., Požévara T., Fach P., Woudstra C., Mahé F., Chemaly M., Le Bouquin S.: Occurrence of *C. botulinum* in healthy cattle and their environment following poultry botulism outbreaks in mixed farms. *Vet. Microbiol.* 2015, 180, 142-145.
36. Souillard R., Woudstra C., Le Maréchal C., Bayon-Auboyer D. M. H., Chemaly M., Fach P., Le Bouquin S.: Investigation of *Clostridium botulinum* in commercial poultry farms in France between 2011 and 2013. *Biosecur. Bioterror.* 2013, 11, 191-199.
37. Villar R. G., Elliott S. P., Davenport K. M.: Botulism: the many faces of botulinum toxin and its potential for bioterrorism. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 2006, 20, 313-327.
38. Weingart O. G., Schreiber T., Mascher C., Pauly D., Dorner M. B., Berger T. F., Egger C., Gessler F., Loessner M. J., Avondet M. A., Dorner B. G.: The case of botulinum toxin in milk: experimental data. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010, 76, 3293-3300.
39. Woneser G., Marsden S., Macfarlane R. J.: Occurrence of toxigenic *Clostridium botulinum* type C in the soil of wetlands in Saskatchewan. *J. Wildl. Dis.* 1987, 23, 67-76.

Adres autora: dr Tomasz Grenda, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;
e-mail: tomasz.grenda@piwet.pulawy.pl